



FR00/02420

BREVET D'INVENTION

10/07/0176

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 11 OCT 2000

WIPO

PCT

DOCUMENT DE PRIORITÉ

COPIE OFFICIELLE

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 SEP. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Martine PLANCHE". The signature is written over a stylized, horizontal oval shape.

Martine PLANCHE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE	SIEGE 26 bis, rue de Saint Petersbourg 75800 PARIS Cedex 08 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30
-------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réserve à l'INPI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES	3 SEPT 1999
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	9911060
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT	75 INPI PARIS
DATE DE DÉPÔT	3 Sept 1999

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

- brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen



1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET ORES
6 Avenue de Messine
75008 PARIS

n°du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
SL/CAhr712/10FR 01 45 62 75 00

date

Établissement du rapport de recherche

différencié immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

HYDROLYSATS ENZYMATIQUES D'HUITRES ET LEURS APPLICATIONS

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

1- IFREMER

Etablissement public

2- ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS

Etablissement public

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

Pays

1- 155 rue Jean-Jacques Rousseau
92138 ISSY-LES-MOULINEAUX

FRANCE

2- 3 avenue Victoria
75004 PARIS

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTIÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

SL/CAhrE712/10FR

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9911060

TITRE DE L'INVENTION :

HYDROLYSATS ENZYMATIQUES D' HUITRES ET LEURS APPLICATIONS

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)
CABINET ORES
6 Avenue de Messine
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :
DURAND Patrick - 61 rue de la Commune de 1871 - 44400 REZE

LANDREIN Annie - 73 rue Hector Berlioz - 44300 NANTES

ROY Philippe - 28 rue des Garennes - 44000 NANTES

LINDENBAUM Albert - 34 rue des Partants - 75020 PARIS

EDEAS Marvin - 22 boulevard Kellermann - 75013 PARIS

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature(s) du (des) demandeur(s) ou du mandataire

Paris, le 3 septembre 1999
M-J. VILLE-PRESLES (n° 93-2009)

HYDROLYSATS ENZYMATIQUES D'HUITRES ET LEURS APPLICATIONS

La présente Invention se rapporte à des hydrolysats enzymatiques d'huîtres ainsi qu'à leurs applications en thérapeutique, en diététique et en cosmétologie.

Les radicaux libres oxygénés sont des atomes ou des molécules qui possèdent un électron non apparié au niveau de leur orbitale externe (OH^\bullet , O_2^\bullet , ROO^\bullet , RO^\bullet , ...). De ce fait, ils sont extrêmement instables et peuvent réagir avec des molécules stables telles que des lipides, des glucides, des protéines ou des acides nucléiques, éléments fondamentaux des cellules, pour apprêter leur électron, réaction qui conduit à la formation en chaîne de nouveaux radicaux libres. De ce fait, les radicaux libres oxygénés sont susceptibles de provoquer de graves altérations cellulaires, telles qu'une mutation ou un vieillissement cellulaire, voire la mort des cellules.

Au niveau cellulaire, des radicaux libres oxygénés se forment en permanence. Ils peuvent également se former au cours des mécanismes de détoxication après exposition à certaines substances ou sous l'effet de radiations. Normalement, la production endogène de radicaux libres oxygénés est contrebalancée par la présence de systèmes de défense représentés, d'une part, par des enzymes (supéroxyde dismutases, catalases, glutathion peroxydases), qui interceptent les formes actives de l'oxygène, et, d'autre part, par des "*piégeurs de radicaux libres*" (glutathion, acide urique, vitamine C, vitamine A, vitamine E, taurine, ...), qui bloquent les peroxydations en chaîne des lipides membranaires, en sorte que les organismes n'ont pas à en souffrir.

Cependant, de nombreuses situations peuvent entraîner la formation excessive de radicaux libres oxygénés : l'exposition intense au soleil, l'intoxication par certains produits chimiques et certains médicaments, l'hyperoxygénéation ou la réoxygénération brutale de tissus préalablement privés d'oxygène, la survenue d'une réaction inflammatoire intense (brûlures, infections, ...) ou chronique. Un excès de radicaux libres oxygénés peut également être lié à une maladie génétique ou à une

diminution des défenses : immaturité des systèmes enzymatiques chez les nouveau-nés, vieillissement, déficits alimentaires en vitamines et oligo-éléments (sélénium, zinc, ...).

Quoi qu'il en soit, on impute à un déséquilibre entre la production et
5 la destruction des radicaux libres oxygénés une responsabilité dans la genèse et l'entretien d'un certain nombre de pathologies chroniques telles : l'athérosclérose, les affections malignes, les pathologies inflammatoires, par exemple la maladie de Crohn, et neuro-dégénératives, par exemple la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson, ou encore le vieillissement, ainsi que de pathologies aiguës comme les
10 lésions de reperfusion post-ischémique, les brûlures, les chocs septiques, les infections virales, les états infectieux graves et les allergies, sans qu'il soit toujours possible de préciser si ces radicaux libres sont la cause ou la conséquence, ou les deux simultanément, de la maladie. On comprend, de ce fait, que de très nombreux travaux visent actuellement à mieux appréhender l'implication des radicaux libres oxygénés en
15 physio-pathologie et à développer des composés ou compositions propres à s'opposer aux effets délétères de ces radicaux libres.

Des Auteurs (LIVINGSTONE et al., 1990, *Funct. Ecol.*, 4, 415-424 ; REGOLI et PRINCIPATO, 1995, *Aquat. Tox.*, 31, 143-164) ont mis en évidence chez les mollusques marins, non seulement la présence de superoxydes dismutases, de
20 catalases et de glutathion peroxydases, mais également celle d'enzymes anti-oxydantes spécifiques comme la glyoxalase, qui catalyse la détoxicification des cétoaldéhydes formés au cours du stress oxydatif, et les glutathion transférases, qui catalysent une grande variété de réactions de conjugaison du glutathion avec des composés xénobiotiques, signant une aptitude de ces organismes à se protéger contre les
25 radicaux libres oxygénés. Par ailleurs, des anti-oxydants comme le glutathion, la vitamine A, la vitamine E et la taurine, ont été détectés chez les mollusques marins, et se sont montrés dans certains cas être quantitativement proportionnels au stress oxydatif subi par ces animaux.

Aussi, il est apparu que les mollusques marins étaient susceptibles de constituer une source de composés antiradicalaires utilisables dans la prévention et le traitement des effets néfastes des radicaux libres oxygénés.

Un certain nombre d'Auteurs se sont plus spécialement intéressés
5 aux potentiels antiradicalaires d'extraits d'huîtres. Notamment :

– TAPIERO et TEW (*Biomed. & Pharmacother.*, 1996, 50, 149-153) ont étudié les effets d'un lyophilisat d'huîtres dénommé JCOE (JAPAN CLINIC Oyster Extract) sur la teneur intracellulaire en hormone stimulant le glutathion (GSH), ainsi que sur l'activité de la glutathion-S-transférase (GST), d'une culture de cellules 10 HL60. Ce lyophilisat est obtenu en chauffant à 80°C pendant 1 heure de la chair d'huîtres, puis en soumettant le produit résultant à une centrifugation (2 heures à 17 000 tr/minute) et en lyophilisant le surnageant ainsi recueilli. TAPIERO et TEW ont ainsi mis en évidence une augmentation significative de la synthèse de la GSH chez les cellules HL60 cultivées en présence du lyophilisat, sans toutefois noter de 15 modification significative de l'activité de la GST.

– YOSHIKAWA et al. (*Biomed. & Pharmacother.*, 1997, 51, 328-332) ont montré qu'un lyophilisat d'huîtres JCOE est capable *in vitro* de piéger les radicaux superoxydes et hydroxyles, et de protéger des cellules de la muqueuse gastrique de rats contre les effets délétères du peroxyde d'hydrogène, lorsque ces 20 cellules sont prétraitées pendant 24 heures par ce lyophilisat.

– KIMURA et al. (*Journal of Ethnopharmacology*, 1998, 59, 117-123) ont montré que des rats nourris avec de l'huile de maïs peroxydée et recevant, deux fois par jour et par voie orale, un extrait aqueux d'huîtres, présentent des taux sériques en acides gras libres, triglycérides et peroxydes lipidiques, et un taux 25 hépatique en cholestérol total moins élevés que ceux observés chez des rats nourris de la même façon mais ne recevant pas d'extrait aqueux d'huîtres. Par ailleurs, ces Auteurs ont mis en évidence la présence, dans cet extrait aqueux, d'une substance capable à la fois d'inhiber la lipolyse induite par l'adrénaline et de stimuler la lipogenèse à partir du glucose dans des cellules adipeuses de rats, et qu'ils ont 30 identifiée comme étant de l'adénosine.

– NOMURA et *al.* ont proposé, dans la Demande de Brevet Européen n° 0 806 465 au nom de JAPAN CLINIC Co. Ltd, de préparer une composition anti-oxydante par un procédé consistant à fractionner par de l'éthanol un extrait aqueux d'huîtres préalablement obtenu en chauffant un mélange de chair d'huîtres et d'eau à une température comprise entre 50 et 90°C et, de préférence, entre 5 80 et 90°C, pendant 2 à 3 heures. Les propriétés anti-oxydantes de la composition ainsi préparée sont mises en évidence, dans cette Demande de Brevet, par le biais de tests visant à apprécier son aptitude à inhiber *in vitro* la réaction entre des anions superoxydes produits par un système enzymatique xanthine-xanthine oxydase et le 10 5,5-diméthyl-1-pyrrolen-1-oxyde.

– DUSSART (*Rapport IFREMER : Stage de VIème Année, 1997, Faculté de Pharmacie, UNIVERSITE DE LILLE II*) a réalisé une étude visant à comparer les propriétés antiradicalaires d'extraits aqueux d'huîtres préparés en mélangeant un broyat de chair d'huîtres avec de l'eau désionisée (1/3, v/v), puis en 15 soumettant le mélange résultant à une centrifugation (20 minutes à 3 000 g) suivie d'une lyophilisation du surnageant, avec celles présentées par des extraits d'huîtres préparés en soumettant un broyat d'huîtres uniquement à une lyophilisation. Les résultats de cette étude montrent que, si les deux types d'extraits d'huîtres ont *in vitro* un effet protecteur contre les oxydations induites d'une part, par un générateur de 20 radicaux peroxydes sur des hématies, et, d'autre part, par le cuivre sur les lipoprotéines de basse densité (LDL), les extraits aqueux d'huîtres apparaissent présenter le potentiel anti-oxydant le plus intéressant.

Or, dans le cadre de leurs travaux, les Inventeurs ont constaté que des hydrolysats d'huîtres, obtenus en soumettant des broyats de chair d'huîtres à une 25 hydrolyse enzymatique dans des conditions appropriées, présentent de manière surprenante une activité antiradicalaire encore plus élevée que celle observée pour les extraits aqueux d'huîtres testés par DUSSART dans l'étude précitée, et sont, donc, susceptibles d'être avantageusement utilisés pour prévenir ou traiter les effets délétères des radicaux libres oxygénés.

La présente Invention a donc pour objet un hydrolysat enzymatique d'huîtres, lequel est caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

- le broyage de chair d'huîtres suivi, éventuellement, d'une dilution
- 5 du broyat obtenu dans de l'eau, et
 - l'hydrolyse, par une protéase, du broyat éventuellement dilué, cette hydrolyse étant conduite dans des conditions de pH et de température convenablement choisies en fonction de ladite protéase.

Selon une première disposition avantageuse de l'Invention, 10 l'hydrolysat enzymatique d'huîtres est susceptible d'être obtenu par un procédé dans lequel l'hydrolyse du broyat est réalisée par une protéase choisie parmi la subtilisine, la pepsine et la trypsine. En effet, outre que ces protéases ont un coût compatible avec une exploitation industrielle de l'Invention, elles présentent l'avantage de faire partie 15 des enzymes dont l'utilisation est autorisée par voie réglementaire pour la préparation d'hydrolysats protéiques entrant dans la fabrication de compléments alimentaires (Arrêté du 21 Décembre 1988).

Dans la mesure où les protéases susceptibles d'être utilisées pour la préparation d'un hydrolysat enzymatique conforme à l'Invention, ne sont pas actives 20 dans les mêmes gammes de pH et de température, les conditions de pH et de température dans lesquelles l'hydrolyse du broyat est conduite dépendent de la protéase choisie pour réaliser cette hydrolyse.

De préférence, ces conditions de pH et de température sont telles 25 qu'elles permettent d'obtenir une activité optimale de la protéase. Ainsi, par exemple, l'hydrolyse est conduite, préférentiellement, à un pH d'environ 8 et une température d'environ 60°C dans le cas de la subtilisine, à un pH d'environ 2 et une température d'environ 40°C dans le cas de la pepsine, et à un pH d'environ 8 et une température d'environ 37°C dans le cas de la trypsine.

Selon une autre disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolysat 30 enzymatique d'huîtres est susceptible d'être obtenu par un procédé dans lequel l'hydrolyse du broyat est conduite pendant un temps suffisant pour que cet hydrolysat

présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30%, ce degré d'hydrolyse protéique étant déterminé par la formule ci-après (ADLER-NISSEN, 1977, *Proc. Biochem.*, 12, 18-23) :

$$DH = (h/h \text{ total}) \times 100$$

5

dans laquelle :

- h total représente le nombre total de liaisons peptidiques présentes dans le broyat au début de la réaction d'hydrolyse, tandis que
- h représente le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées au cours de l'hydrolyse, et est déterminé par la différence entre le nombre d'extrémités aminées (ou carboxyliques) libres présentes dans l'hydrolysat au terme de la réaction d'hydrolyse (h) et le nombre d'extrémités aminées (ou carboxyliques) libres présentes dans le broyat au début de la réaction d'hydrolyse (h_0).

10

15

Au sens de la présente Invention, le début de la réaction d'hydrolyse

correspond au moment où la protéase est mise en contact avec le broyat de chair d'huîtres, tandis que le terme de cette réaction correspond au moment où la réaction d'hydrolyse est arrêtée par inactivation de ladite protéase, par exemple par dénaturation thermique ou par modification du pH.

20

25

25

30

30

Le nombre total de liaisons peptidiques (h total) présentes dans le broyat peut être obtenu par la différence entre la quantité d'acides aminés totaux (libres + liés) et la quantité d'acides aminés libres que renferme ce broyat. Ces quantités d'acides aminés totaux et libres peuvent être déterminées, par exemple au moyen d'une trousse telle que celle commercialisée sous la marque WATERS AccQ-Tag Chemistry Package® par la Société WATERS. Le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées (h) au cours de l'hydrolyse est, lui, obtenu par la différence entre la quantité d'extrémités aminées libres (h) présentes dans l'hydrolysat au terme de la réaction d'hydrolyse et la quantité d'extrémités aminées libres (h_0) présentes dans le broyat au début de la réaction d'hydrolyse, lesquelles peuvent être déterminées, par exemple, par réaction avec du fluorodinitrobenzène selon le protocole décrit dans *Biochem. J.*, 45, 563, 1949.

Là également, le temps qu'il convient de laisser la réaction d'hydrolyse se faire, afin d'obtenir un hydrolysat enzymatique présentant un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30%, dépend de la protéase choisie pour réaliser cette hydrolyse, et, pour une même protéase, des conditions de pH, de température dans lesquelles l'hydrolyse est conduite, ainsi que de la dose à laquelle cette protéase est utilisée, la réaction d'hydrolyse s'effectuant, en effet, d'autant plus rapidement que la dose de protéase est plus élevée.

Selon encore une autre disposition avantageuse de l'Invention, l'hydrolysat enzymatique d'huîtres est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend, de plus, une étape de recueil de la phase liquide du broyat ou du mélange broyat/eau - dans le cas où le broyat a été préalablement dilué - au terme de la réaction d'hydrolyse. Ce recueil, qui est destiné à éliminer les différents débris (débris de coquilles, débris membranaires, ...) susceptibles d'être présents dans le broyat hydrolysé, peut être réalisé par toutes les techniques classiquement utilisées pour séparer une phase liquide d'une phase solide telle que la centrifugation, l'ultracentrifugation, la filtration, la microfiltration, ces techniques pouvant être avantageusement combinées entre elles.

Selon une disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat enzymatique est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse, par de la subtilisine, du broyat ainsi dilué à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 60°C, et
- d) le recueil de la phase liquide du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

Selon une autre disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat enzymatique d'huîtres est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse, par de la pepsine, du broyat ainsi dilué à un pH 5 d'environ 2 et à une température d'environ 40°C, et
- d) le recueil de la phase liquide du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

Selon encore une autre disposition préférée de l'Invention, l'hydrolysat enzymatique d'huîtres est susceptible d'être obtenu par un procédé qui 10 comprend :

- a) le broyage de chair d'huîtres,
- b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse, par de la trypsine, du broyat ainsi dilué à un pH 15 d'environ 8 et à une température d'environ 37°C, et
- d) le recueil de la phase liquide du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

De tels hydrolysats enzymatiques d'huîtres présentent des propriétés antiradicalaires qui, outre d'être prononcées, sont extrêmement intéressantes puisqu'ils 20 s'avèrent être capables, non seulement de neutraliser les effets des radicaux libres oxygénés produits au cours de réactions de peroxydation, mais également d'empêcher la formation de ces radicaux libres par ce qui apparaît être un mécanisme de chélation des métaux comme par exemple le cuivre, qui sont impliqués dans la génèse desdits radicaux libres.

Ils sont donc susceptibles d'être avantageusement utilisés pour la 25 préparation de compositions destinées à combattre les effets néfastes des radicaux libres et, plus particulièrement, de médicaments, de compléments alimentaires et de produits cosmétiques.

A cette fin, ils peuvent être utilisés soit tels quels, c'est-à-dire sous 30 forme aqueuse ou éventuellement sous la forme de poudres sèches obtenues par

exemple, par lyophilisation, soit en mélange avec des excipients physiologiquement acceptables et/ou d'autres substances actives et, notamment, des substances ayant également des propriétés antiradicalaires intrinsèques, et capables d'agir de manière synergique (vitamines A, C ou E, par exemple), au sein de formulations plus complexes.

La présente Invention a, donc, également pour objet une composition pharmaceutique qui est caractérisée en ce qu'elle comprend un hydrolysat enzymatique d'huîtres tel que précédemment défini.

Une telle composition pharmaceutique est susceptible de présenter un intérêt pour les cliniciens spécialisés dans les pathologies concernées par les radicaux libres, telles que décrites précédemment.

La présente Invention a aussi pour objet une composition diététique propre à être utilisée comme complément alimentaire et qui est caractérisée en ce qu'elle comprend un hydrolysat enzymatique d'huîtres tel que précédemment défini.

Une telle composition diététique est susceptible d'être utilisée, soit en tant qu'adjuvant à un traitement médical, soit à titre préventif, notamment par des personnes chez lesquelles il est souhaitable de renforcer les mécanismes naturels de défense contre les radicaux libres oxygénés, parce que ces moyens de défense sont physiologiquement diminués (personnes âgées, personnes souffrant de déficits alimentaires en vitamines et oligo-éléments, ...) ou parce que ces personnes sont amenées à se trouver dans des situations favorisant la formation excessive de radicaux libres oxygénés (exposition intense au soleil, exposition aux produits chimiques, ...).

La présente Invention a encore pour objet une composition cosmétique qui est caractérisée en ce qu'elle comprend un hydrolysat enzymatique d'huîtres tel que précédemment défini.

Une telle composition cosmétique est susceptible, elle, de trouver des applications dans la prévention et le traitement du vieillissement cutané, dont l'origine est en grande partie liée aux radicaux libres générés au niveau cutané par le rayonnement ultraviolet..

La présente Invention a, en outre, pour objet l'utilisation d'un hydrolysat enzymatique d'huîtres tel que précédemment défini pour la préparation d'une composition pharmaceutique, diététique ou cosmétique antiradicalaire.

Outre les dispositions qui précèdent, l'Invention comprend encore 5 d'autres dispositions qui ressortiront du complément de description qui suit, qui se rapporte à des exemples illustrant l'activité hydrolytique d'enzymes sur des broyats d'huîtres, la préparation d'hydrolysats enzymatiques conformes à l'Invention ainsi que les propriétés biologiques de ces hydrolysats, et qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

10 – la Figure 1 représente la cinétique de deux hydrolyses conduites sur des broyats de chair d'huîtres avec deux doses différentes de subtilisine ; tandis que

– la Figure 2 représente la cinétique d'une hydrolyse conduite sur un broyat de chair d'huîtres avec de la pepsine.

15 Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustrations de l'objet de l'Invention et n'en constituent en aucune manière une limitation

EXAMPLE 1 : Etude de l'activité hydrolytique de la subtilisine sur des broyats de chair d'huîtres

20 Des huîtres creuses *Crassostrea gigas* vivantes, provenant de la station conchylicole expérimentale IFREMER de Bouin (VENDEE - FRANCE), après extraction de leurs coquilles, sont égouttées, puis broyées pendant 2 minutes à 1 000 tr/minute à l'aide d'un Ultra-Turrax® (de puissance maximale égale à 170 W à 2 000 tr/minute).

25 Le broyat obtenu, après une éventuelle conservation à une température de -20°C et, dans ce cas, une décongélation, est introduit dans un réacteur. Il est additionné, sous agitation, de 60% (v/m) d'eau désionisée. Puis, on introduit dans le réacteur, toujours sous agitation, une dose de 14 UA (unités actives) ou de 38 UA de subtilisine (commercialisée sous la marque alcalase® 2.4L par la Société NOVO 30 NORDISK) par kg du mélange qu'il contient. La température du réacteur est

maintenue à 60°C pendant toute la durée de l'hydrolyse, soit pendant 4 heures. L'agitation est également maintenue et le pH est régulé à l'aide d'un pH-stat de manière à être constamment à une valeur de 8.

5 Au terme des 4 heures d'hydrolyse, l'activité de la subtilisine est arrêtée par dénaturation thermique de cette dernière, en plaçant le mélange réactionnel dans un bain-marie à 90°C pendant 25 minutes.

Des échantillons sont prélevés dans le réacteur, au moyen d'une pompe péristaltique, juste avant que n'y soit introduite la subtilisine (t_0), puis 15 et 30 minutes après l'introduction de cette enzyme dans le réacteur (soit à t_{15} et t_{30}), puis 10 toutes les 30 minutes et ce, jusqu'à l'arrêt de l'hydrolyse (soit à t_{60} , t_{90} , t_{120} , t_{150} , t_{180} , t_{210} et t_{240}). Les échantillons qui renferment de la subtilisine sont placés dans un bain-marie à 90°C pendant 25 minutes de manière à stopper l'activité de cette dernière. Puis, tous les échantillons sont soumis à une centrifugation à 13 000 tr/minute. Les surnageants sont filtrés sur une membrane de 0,7 µm, puis sur une membrane de 0,16 µm.

15 L'activité hydrolytique de la subtilisine est appréciée en suivant :

– d'une part, l'évolution de la concentration des broyats en extrémités aminées libres entre t_{15} et t_{240} , en dosant ces extrémités par réaction avec du fluorodinitrobenzène, ce suivi permettant d'établir la cinétique de l'hydrolyse, et
– d'autre part, l'évolution du degré d'hydrolyse protéique (DH) des 20 broyats entre t_{15} et t_{240} , ce degré d'hydrolyse protéique étant calculé selon la formule DH = (h/h total) x 100, dans laquelle h total est obtenu par le dosage des acides aminés totaux et libres présents dans les broyats à l'aide d'une trousse WATERS AccQ-Tag Chemistry Package®, tandis que h est déterminé par le dosage des extrémités aminées libres présentes dans les échantillons prélevés à t_{15} , t_{30} , ..., jusqu'à 25 t_{240} inclus, par réaction avec du fluorodinitrobenzène.

La Figure 1 représente la cinétique de l'hydrolyse conduite avec la dose de subtilisine de 14 UA/kg (■) et celle conduite avec la dose de subtilisine de 38 UA/kg (◆), les valeurs des concentrations en extrémités aminées libres étant exprimées en ordonnées et en mM, le temps étant exprimé en abscisses et en minutes.

Cette Figure montre que l'hydrolyse est plus rapide lorsque la dose de subtilisine est augmentée. Ainsi, le plateau est atteint au bout de 90 minutes d'hydrolyse pour la dose de 14 UA/kg, et ce délai est réduit à 60 minutes pour la dose de 38 UA/kg. Toutefois, la concentration en extrémités aminées libres pour laquelle le plateau est atteint est similaire pour les deux doses d'enzyme. Il en est de même de la concentration finale en extrémités aminées libres (environ 120 mM).

Le Tableau I ci-après présente les valeurs des degrés d'hydrolyse protéique (DH), exprimées en pourcentages, obtenues pour chacune des doses de subtilisine.

10

TABLEAU I

Temps (minutes)	DH (%)	
	14 UA/kg	38 UA/kg
15	14	—
30	23	31
60	34	46
90	45	48
120	47	51
150	50	51
180	47	56
210	54	54
240	54	58

Ce Tableau montre que, quelle que soit la dose de subtilisine utilisée, la vitesse d'hydrolyse diminue lorsque 45% des liaisons peptidiques potentiellement hydrolysables ont été rompues. L'hydrolyse se poursuit toutefois, mais de manière discrète, puisque les valeurs finales du degré d'hydrolyse protéique dépassent 50%, pour atteindre 54% dans un cas, et 58% dans l'autre cas.

EXEMPLE 2 : Etude de l'activité hydrolytique de la pepsine sur des broyats de chair d'huîtres

L'activité hydrolytique de la pepsine sur des broyats de chair d'huîtres est appréciée en utilisant un protocole opératoire identique à celui utilisé dans l'exemple 1, à ceci près que l'hydrolyse est conduite avec une dose de 1% en masse de pepsine rapportée à la masse totale du mélange broyat/eau désionisée présent dans le réacteur, à une température de 40°C et à un pH égal à 2.

La Figure 2 représente la cinétique de l'hydrolyse ainsi obtenue, les valeurs des concentrations en fonctions amines libres étant exprimées en ordonnées et en mM, le temps étant exprimé en abscisses et en minutes.

Cette Figure montre que l'hydrolyse s'effectue nettement plus rapidement que lorsqu'elle est conduite avec de la subtilisine, même à la dose de 38 UA/kg, puisque le plateau est atteint 30 minutes après l'introduction de la pepsine dans le réacteur. Toutefois, la concentration finale en fonctions amines libres dans l'hydrolysat, qui se situe aux environs de 120 mM, est tout à fait comparable à celle obtenue lorsque l'hydrolyse est conduite avec de la subtilisine.

EXEMPLE 3 : Préparation d'hydrolysats enzymatiques d'huîtres conformes à l'Invention par utilisation de la subtilisine

Sur la base des résultats obtenus dans l'étude objet de l'exemple 1, on prépare deux hydrolysats présentant des degrés d'hydrolyse protéique différents - qui seront dénommés ci-après respectivement hydrolysat A et hydrolysat B - en soumettant deux broyats de chair d'huîtres à une hydrolyse par de la subtilisine.

Les broyats de chair d'huîtres sont préparés et les hydrolyses sont conduites dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 1, en utilisant une dose de subtilisine de 38 UA par kg de mélange broyat/eau désionisée.

Pour l'hydrolysat A, l'hydrolyse est arrêtée 4 heures après l'introduction de l'enzyme dans le réacteur, de manière à ce qu'il présente un degré d'hydrolyse protéique maximal, soit proche de 60%.

Pour l'hydrolysat B, l'hydrolyse est arrêtée 30 minutes après introduction de l'enzyme dans le réacteur, afin qu'il présente un degré d'hydrolyse

protéique sensiblement égal à la moitié du degré d'hydrolyse protéique maximal, soit d'environ 30%.

Dans les deux cas, l'activité hydrolytique de la subtilisine est stoppée en plaçant les mélanges réactionnels dans un bain-marie à 90°C pendant 25 minutes. Les mélanges sont ensuite centrifugés à 4 000 tr/minute. Les surnageants sont filtrés sur une membrane de 0,7 µm, puis sur une membrane de 0,16 µm. Les hydrolysats ainsi préparés présentent un aspect granuleux de couleur brun-vert. Ils sont lyophilisés et placés dans des flacons à -20°C.

EXEMPLE 4 : Caractérisation biochimique d'un hydrolysat enzymatique d'huîtres conforme à l'Invention

On réalise une étude visant à déterminer pour l'hydrolysat A préparé selon l'exemple 3 :

- sa teneur en matière sèche,
- sa teneur en matière minérale,
- sa teneur en protéines solubles,
- sa teneur en sucres totaux et en glycogène, ainsi que
- sa teneur et sa composition en acides aminés totaux et en acides aminés libres,

et à comparer les résultats avec ceux obtenus, dans les mêmes conditions, d'une part, pour un broyat de chair d'huîtres préparé comme décrit dans l'exemple 1 et d'autre part, pour un extrait aqueux d'huîtres préparé :

- en mélangeant un broyat de chair d'huîtres avec de l'eau désionisée (1/3, v/v) jusqu'à obtenir un mélange homogène, puis
- en soumettant le mélange résultant à une centrifugation à 3000 g pendant 20 minutes, et
- en lyophilisant le surnageant recueilli au terme de cette centrifugation.

La teneur en matière sèche est déterminée en plaçant des échantillons de l'hydrolysat A à une température de 100°C jusqu'à l'obtention d'un

poids constant (6 heures minimum), et en calculant le pourcentage représenté par ce poids par rapport au poids initial de ces échantillons.

La teneur en matière minérale est déterminée en incinérant des échantillons de l'hydrolysat A à une température de 600°C pendant 12 heures, et en 5 calculant le pourcentage représenté par le poids du résidu par rapport au poids de la matière sèche.

Les protéines solubles sont dosées à l'aide de la trousse commercialisée par la Société PIERCE sous la dénomination commerciale BCA® Protein Assay Reagent. L'albumine bovine est utilisée comme étalon.

10 Les sucres totaux et le glycogène sont dosés selon la méthode décrite par M. DUBOIS et al. (*Anal. Chem.*, 1956, 28, 350-356). Pour ces dosages, les échantillons sont préalablement délipidés selon la méthode de E. G. BLIGHT et W. J. DYER (*Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, 37, 911-917).

15 La teneur et la composition en acides aminés totaux et en acides aminés libres sont, quant à elles, déterminées à l'aide d'une trousse WATERS AccQ-Tag Chemistry Package®. Pour le dosage des acides aminés totaux, les échantillons de l'hydrolysat A sont préalablement soumis à une hydrolyse acide, par action d'HCl 6N pendant 12 heures, à 110°C et sous vide, tandis que, pour le dosage des acides aminés libres, les échantillons de l'hydrolysat A sont préalablement additionnés d'acide sulfosalicilique et centrifugés de manière à provoquer une précipitation des protéines 20 présentes dans ces échantillons.

25 Le Tableau II ci-après présente les teneurs en matière sèche, en matière minérale, en protéines solubles, en sucres totaux, en glycogène, en acides aminés totaux et en acides aminés libres présentées respectivement par l'hydrolysat A, le broyat d'huîtres et l'extrait aqueux d'huîtres.

Les teneurs en matière sèche sont exprimées en pourcentages par rapport au poids lyophilisé (% p/p) des échantillons, sauf dans le cas du broyat où la matière sèche est exprimée en pourcentage par rapport au poids frais (% p/p*) des échantillons. Les teneurs en matière minérale, en protéines solubles, en sucres totaux,

en glycogène, en acides aminés totaux et en acides aminés libres sont exprimées en pourcentages par rapport aux poids sec (% p/p) des échantillons.

TABLEAU II

	Hydrolysat A	Broyat	Extrait aqueux
Matière sèche (% p/p)	96,23 (% p/p)	10,20 (% p/p*)	95 (% p/p)
Matière minérale (% p/p)	36,43	37,33	37
Protéines solubles (% p/p)	13,25	30	15
Sucres totaux (% p/p)	8,52	6,63	3,7
Glycogène (% p/p)	1,29	1	1,5
Acides aminés totaux (% p/p)	35,1	36,7	20,15
Acides aminés libres (% p/p)	17,8	7	8,10

5

Le Tableau III ci-après présente, lui, les compositions en acides aminés totaux et libres de l'hydrolysat A, du broyat d'huîtres et de l'extrait aqueux d'huîtres. Les teneurs de chaque acide aminé sont exprimées en pourcentages par rapport au poids total (% p/p) des acides aminés présents dans les échantillons.

TABLEAU III

Acides aminés	HYDROLYSAT A		BROYAT		EXTRAIT AQUEUX	
	AA totaux (% p/p)	AA libres (% p/p)	AA totaux (% p/p)	AA libres (% p/p)	AA totaux (% p/p)	AA libres (% p/p)
Taurine	10,67	19,25	11,48	55,98	30,47	60,66
Hydroxyproline	—	—	—	—	—	—
Acide aspartique	10,08	2,45	10,43	4,79	11,26	0,72
Thréonine	5,02	4,07	4,79	—	4,16	—
Sérine	4,67	6,58	5,02	2,28	4,46	2,21
Acide glutamique	13,26	8,08	13,49	8,60	11,91	11,46
Proline	5,12	2,20	4,85	7,59	—	—
Glycine	6,31	3,61	6,49	6,81	5,31	5,05
Alanine	5,64	6,43	4,39	3,21	5,80	8,01
Cystéine	—	—	—	—	—	—
Valine	4,51	4,94	4,16	0,42	2,77	—
Méthionine	2,13	2,76	2,06	—	1,53	—
Isoleucine	4,02	4,38	3,36	—	2,58	—
Leucine	6,18	7,63	6,32	0,65	4,66	—
Tyrosine	3,39	5,04	3,27	—	1,73	2,95
Phénylalanine	3,53	4,71	3,29	0,26	2,72	—
Hydroxylsine	—	—	—	—	—	—
Lysine	6,28	7,00	7,04	3,59	5,21	0,73
Histidine	2,33	2,92	2,92	1,70	1,24	—
Arginine	6,86	7,94	6,65	4,11	4,16	1,72

Le Tableau II montre que l'hydrolysat A présente une teneur en sucres totaux supérieure à celles retrouvées dans le broyat et dans l'extrait aqueux. Cet accroissement est dû à la déstructuration des tissus provoquée par l'hydrolyse enzymatique, permettant ainsi une plus forte solubilisation des sucres. La diminution de la teneur en protéines solubles que l'on observe entre le broyat et l'hydrolysat est une conséquence de l'hydrolyse des protéines natives. Cette hydrolyse génère une quantité importante de peptides et d'acides aminés libres qui réagissent peu avec le réactif utilisé pour le dosage des protéines solubles (BCA₀). Par contre, la teneur en matières minérales ne varie pas entre les trois préparations.

Par ailleurs, il résulte du Tableau II que la teneur en acides aminés libres de l'hydrolysat A est notablement plus élevée que la teneur en acides aminés libres de l'extrait aqueux d'huîtres, cette dernière étant très proche de celle retrouvée pour le broyat de chair d'huîtres. L'augmentation de la quantité d'acides aminés libres présents dans l'hydrolysat A est directement liée à la rupture des liaisons peptidiques provoquée par la réaction d'hydrolyse.

Toutefois, au vu du Tableau III, il apparaît que la proportion de taurine libre, qui est connue pour présenter une activité anti-oxydante, est plus faible dans l'hydrolysat A que dans l'extrait aqueux d'huîtres. En effet, la taurine sous forme libre représente 60,66% des acides aminés libres dans l'extrait aqueux d'huîtres contre seulement 19,25% dans l'hydrolysat A.

EXEMPLE 4 : Activité biologique des hydrolysats enzymatiques d'huîtres conformes à l'Invention

L'activité biologique des hydrolysats A et B préparés selon l'exemple 3 est appréciée par une série d'expérimentations visant à tester :

- d'une part, l'aptitude de ces hydrolysats à inhiber l'hémolyse induite par l'introduction d'un générateur de radicaux peroxydes, à savoir le 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dichlorhydrique (AAPH), dans une suspension d'hématies, et
- d'autre part, l'aptitude de ces hydrolysats à protéger les lipoprotéines de basse densité, plus connues sous la terminologie anglaise « *Low Density Lipoproteins* » (LDL) contre une oxydation induite par le cuivre.

4.1 - Inhibition de l'hémolyse induite par l'AAPH :

a) Protocole :

5 ml de sang humain sont prélevés sur tube EDTA (lequel est immédiatement placé dans de la glace pilée) et centrifugés pendant 10 minutes, à 5 1 000 g et à 4°C. Le plasma est éliminé et les hématies sont lavées 3 fois avec une solution de NaCl à 9 % ou avec du tampon PBS (pH 7,4). 200 µl du culot cellulaire d'hématies sont ensuite dilués dans 9,8 µl de solution de NaCl à 9% ou de tampon PBS.

Dans un premier temps, la suspension globulaire obtenue est mise en 10 contact pendant 10 minutes avec les solutions (NaCl 9% ou PBS) d'hydrolysats A ou B dont le volume est calculé de manière à ce que la solution finale corresponde à 25, 50 et 100 mg/l. Un échantillon sans hydrolysat constitue le témoin.

300 µl d'une solution d'AAPH ayant préalablement été mise à 15 incuber à 37°C sont alors introduits dans les suspensions d'hématies et l'ensemble est disposé sous agitation douce au bain-marie pendant 40 minutes.

Un échantillon de la suspension d'hématies (sans AAPH ou produit) est parallèlement disposé pendant 1 heure à -80°C.

La lyse des hématies est appréciée en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) à l'aide d'un automate HITACHI 911. Chaque mesure est 20 réalisée en double.

L'activité LDH déterminée sur les échantillons disposés à -80°C correspond à l'hémolyse totale des hématies.

L'activité LDH déterminée sur les échantillons ne contenant pas d'hydrolysat correspond à la sensibilité des hématies au « stress radicalaire » dans les 25 conditions expérimentales. Cette mesure permet par ailleurs de vérifier que les conditions expérimentales (hémolyse < 100 %) sont convenables pour l'étude.

Pour chaque concentration d'hydrolysat, l'activité LDH est comparée à l'activité des échantillons ne contenant pas de produit et exprimée en pourcentage d'activité.

b) Résultats :

Le Tableau IV ci-après présente la moyenne des pourcentages d'inhibition (Ia) obtenus pour des solutions de 25, 50 et 100 mg/l d'hydrolysat A et d'hydrolysat B.

5

TABLEAU IV

Concentration (mg/l)	Ia (%)	
	Hydrolysat A	Hydrolysat B
25	38	25
50	74	48
100	96	98

Ce Tableau montre que les hydrolysats enzymatiques d'huîtres conformes à l'Invention présentent une aptitude marquée à inhiber l'hémolyse induite par l'introduction d'un générateur de radicaux peroxydes au sein d'une suspension d'hématies - ce qui signifie qu'ils sont capables de neutraliser les effets oxydants de ces radicaux peroxydes -, puisque la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) de l'hydrolysat A est comprise entre 25 et 50 mg/l, tandis que celle de l'hydrolysat B s'élève à 50 mg/l.

15 A titre de comparaison, la concentration inhibitrice 50 (IC_{50}) obtenue par DUSSART (*ibid*) pour un extrait aqueux d'huîtres est de 275 mg/l.

4.2 – Protection des LDL contre une oxydation induite par le cuivre :

a) Protocole :

Les LDL sont préparées à partir de 100 ml de plasma (sang prélevé sur EDTA). Dans un premier temps, les VLDL sont éliminées par ultracentrifugation, 20 24 heures à 40 000 g (densité : 1,019). Une seconde ultracentrifugation, 24 heures à 40 000 g (densité : 1,063) permet l'obtention des LDL. Les LDL sont alors dialysées

pendant 24 heures à 4°C contre du tampon TRIS-EDTA, aliquotées puis conservées à 4° C.

Les LDL (0,2 mg de protéines/ml de solution), préalablement dialysées contre du tampon PBS, sont mises à incuber 24 heures à 37°C en présence 5 de cuivre (oxydant) et en présence ou non des produits étudiés.

Pour chaque étude, 3 déterminations sont donc réalisées parallèlement :

- LDL en absence de cuivre (témoin LDL natives),
- LDL en présence de 5 µM de sulfate de cuivre (témoin LDL 10 oxydées),
- LDL en présence de 5 µM de sulfate de cuivre et de concentrations croissantes des hydrolysats A et B.

Après arrêt de l'oxydation par du BHT/EDTA, la solution de LDL est dialysée 24 heures à + 4°C et filtrée sur membrane « millipore » de 0,2 µm.

15 L'effet inhibiteur des hydrolysats vis à vis de l'oxydation des LDL par le cuivre est quantifié par le dosage de 2 marqueurs de lipoperoxydation :

- le MDA (malondialdéhyde), pour le calcul du pourcentage d'inhibition Ib,
- les hydroperoxydes, pour le calcul du pourcentage d'inhibition 20 Ic.

- dosage du MDA

Le MDA forme avec l'acide thiobarbiturique, à chaud et en milieu acide, un complexe chromogène fluorescent. Après extraction par le butanol normal, l'intensité de la fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les 25 concentrations de MDA sont déterminées au moyen d'une gamme de MDA s'étendant de 0,2 à 1 nmole.

- Dosage des hydroperoxydes

Les hydroperoxydes libèrent l'iode à partir d'une solution stabilisée d'iodure de potassium. L'iode libéré est mesuré par détermination de la densité 30 optique (DO) à 365nm.

La concentration en iodé de l'échantillon est ensuite calculée à partir du coefficient d'extinction $\epsilon (=2,46 \cdot 10^4, 1\text{cm}, 1\text{M})$ de cet élément.

b) Résultats :

Les Tableaux V et VI ci-après présentent respectivement les pourcentages d'inhibition (Ib) et (Ic) tels qu'obtenus pour des solutions de 25, 50, 100 et 250 mg/l d'hydrolysat A et d'hydrolysat B.

TABLEAU V

Concentration (mg/l)	Ib (%)	
	Hydrolysat A	Hydrolysat B
25	-9	40
50	75	82
100	73	86
250	86	89

10

15

20

TABLEAU VI

Concentration (mg/l)	Ic (%)	
	Hydrolysat A	Hydrolysat B
25	10	71
50	100	100
100	100	100
250	100	100

Ces Tableaux montrent que les hydrolysats enzymatiques d'huîtres
 5 conformes à l'Invention ont également une aptitude prononcée à s'opposer à une oxydation des LDL induite par le cuivre, aptitude qui pourrait être liée à un effet chélateur vis-à-vis des métaux.

REVENDICATIONS

1. Hydrolysat enzymatique d'huîtres, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé comprenant les étapes suivantes :

– le broyage de chair d'huîtres suivi, éventuellement, d'une dilution
5 du broyat obtenu dans de l'eau, et

– l'hydrolyse, par une protéase, du broyat éventuellement dilué, cette hydrolyse étant conduite dans des conditions de pH et de température convenablement choisies en fonction de ladite protéase.

10 2. Hydrolysat enzymatique d'huîtres selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé dans lequel l'hydrolyse du broyat est réalisée par une protéase choisie parmi la subtilisine, la pepsine et la trypsine.

15 3. Hydrolysat enzymatique d'huîtres selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé dans lequel l'hydrolyse du broyat est conduite pendant un temps suffisant pour que cet hydrolysat présente un degré d'hydrolyse protéique au moins égal à 30%, ce degré d'hydrolyse protéique étant déterminé par la formule ci-après :

$$DH = (h/h_{total}) \times 100$$

20

dans laquelle :

– h_{total} représente le nombre total de liaisons peptidiques présentes dans le broyat au début de la réaction d'hydrolyse, tandis que
25 – h représente le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées au cours de l'hydrolyse, et est déterminé par la différence entre le nombre d'extrémités aminées libres présentes dans l'hydrolysat au terme de la réaction d'hydrolyse (h_t) et le nombre d'extrémités aminées libres présentes dans le broyat au début de la réaction d'hydrolyse (h_0).

30 4. Hydrolysat enzymatique d'huîtres selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend, de plus, une étape de recueil de la phase liquide du broyat ou du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

5. Hydrolysat enzymatique d'huîtres selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres,
- 5 b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse, par de la subtilisine, du broyat ainsi dilué à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 60°C, et
- 10 d) le recueil de la phase liquide du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

6. Hydrolysat enzymatique d'huîtres selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend les étapes suivantes :

- a) le broyage de chair d'huîtres,
- 15 b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse, par de la pepsine, du broyat ainsi dilué à un pH d'environ 2 et à une température d'environ 40°C, et
- d) le recueil de la phase liquide du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

7. Hydrolysat enzymatique d'huîtres selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par un procédé qui comprend :

- a) le broyage de chair d'huîtres,
- 25 b) la dilution du broyat dans de l'eau, dans un rapport broyat/eau compris entre 30/70 et 70/30 (m/v), et, de préférence, entre 40/60 et 60/40 (m/v),
- c) l'hydrolyse, par de la trypsine, du broyat ainsi dilué à un pH d'environ 8 et à une température d'environ 37°C, et
- 30 d) le recueil de la phase liquide du mélange broyat/eau au terme de la réaction d'hydrolyse.

8. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un hydrolysat enzymatique d'huîtres selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9. Composition diététique propre à être utilisée comme complément alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend un hydrolysat enzymatique d'huîtres
5 selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

10. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend un hydrolysat enzymatique d'huîtres selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

11. Utilisation d'un hydrolysat enzymatique selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 pour la préparation d'une composition antiradicalaire, cette
10 composition pouvant être une composition pharmaceutique, diététique ou cosmétique.

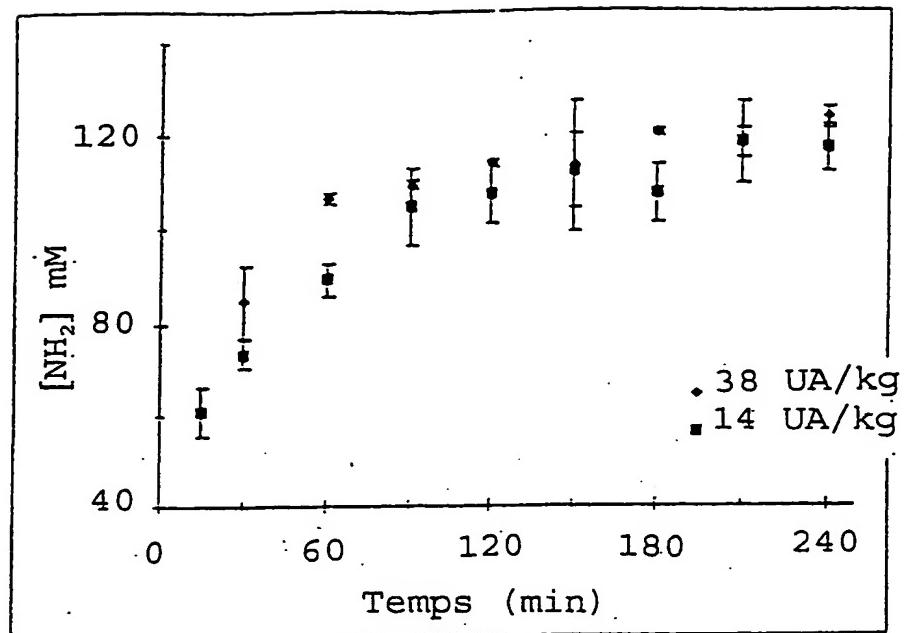


Fig. 1

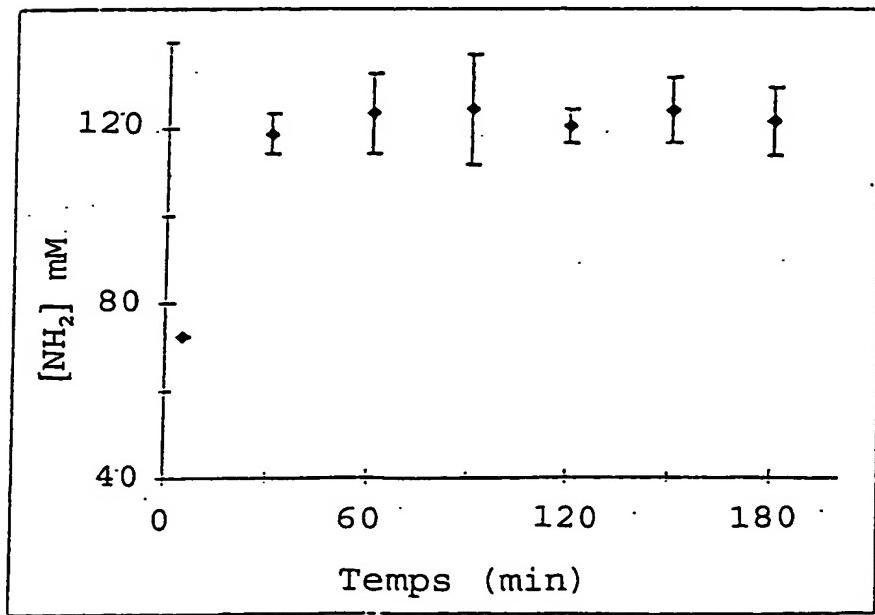


Fig. 2



100-100

